

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
31. März 2005 (31.03.2005)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2005/029149 A1

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: **G02B 21/00**

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2004/052293

(22) Internationales Anmeldedatum:
23. September 2004 (23.09.2004)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
103 44 410.6 25. September 2003 (25.09.2003) DE
10 2004 044 310.6
10. September 2004 (10.09.2004) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): **LEICA MICROSYSTEMS HEIDELBERG GMBH** [DE/DE]; Am Friedensplatz 3, 68165 Mannheim (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **ULRICH, Heinrich** [DE/DE]; Langgewann 2, 69121 Heidelberg (DE). **KNEBEL, Werner**; Hebelstrasse 17/1, 76709 Kronau (DE). **MÖLLMANN, Kyra** [DE/DE]; Köhlerweg 10, 67705 Trippstadt (DE). **HOFFMANN, Jürgen**; Weilstrasse 2, 65520 Bad-Camberg (DE).

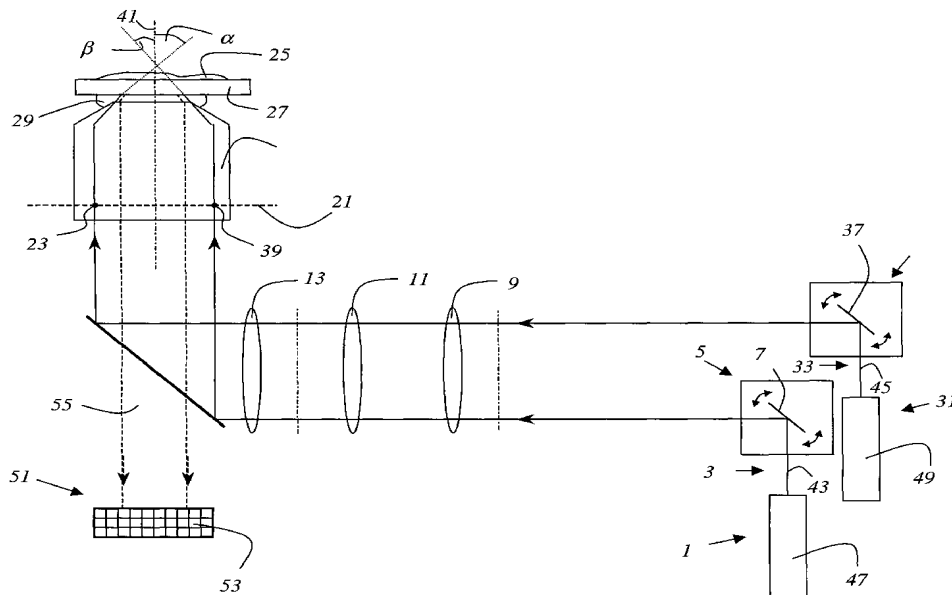
(74) Anwalt: **REICHERT, Werner F.**; Leica Microsystems AG, Corporate Patents + Trademarks Department, Ernst-Leitz-Strasse 17-37, 35578 Wetzlar (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM,

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: MICROSCOPE WITH EVANESCENT WAVE ILLUMINATION

(54) Bezeichnung: MIKROSKOP MIT EVANESZENTER BELEUCHTUNG



(57) Abstract: The invention relates to a microscope with a first and a second illuminating light beam (3, 38), for the illumination of a sample (25), characterised in that the first and/or the second illuminating light beam (3, 33) illuminates the sample (25) with an evanescent wave. For a CARS investigation, the first illuminating light beam can be a pumped light beam (43) and the second illuminating light beam can be a Stokes light beam (45). In order to achieve an increase in resolution, the first illumination light beam can be an excitation beam and the second illuminating light beam can be a stimulating light beam.

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

WO 2005/029149 A1



TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

- (84) **Bestimmungsstaaten** (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Erklärungen gemäß Regel 4.17:

- hinsichtlich der Berechtigung des Anmelders, ein Patent zu beantragen und zu erhalten (Regel 4.17 Ziffer ii) für die folgenden Bestimmungsstaaten AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW, ARIPO Patent (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)
- hinsichtlich der Berechtigung des Anmelders, ein Patent zu beantragen und zu erhalten (Regel 4.17 Ziffer ii) für die folgenden Bestimmungsstaaten AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW, ARIPO Patent (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)
- hinsichtlich der Berechtigung des Anmelders, ein Patent zu beantragen und zu erhalten (Regel 4.17 Ziffer ii) für die folgenden Bestimmungsstaaten AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW, ARIPO Patent (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)

UA, UG, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW, ARIPO Patent (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)

- hinsichtlich der Berechtigung des Anmelders, ein Patent zu beantragen und zu erhalten (Regel 4.17 Ziffer ii) für die folgenden Bestimmungsstaaten AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW, ARIPO Patent (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)
- hinsichtlich der Berechtigung des Anmelders, die Priorität einer früheren Anmeldung zu beanspruchen (Regel 4.17 Ziffer iii) für alle Bestimmungsstaaten
- hinsichtlich der Berechtigung des Anmelders, die Priorität einer früheren Anmeldung zu beanspruchen (Regel 4.17 Ziffer iii) für alle Bestimmungsstaaten
- hinsichtlich der Berechtigung des Anmelders, die Priorität einer früheren Anmeldung zu beanspruchen (Regel 4.17 Ziffer iii) für alle Bestimmungsstaaten
- hinsichtlich der Berechtigung des Anmelders, die Priorität einer früheren Anmeldung zu beanspruchen (Regel 4.17 Ziffer iii) für alle Bestimmungsstaaten
- hinsichtlich der Berechtigung des Anmelders, die Priorität einer früheren Anmeldung zu beanspruchen (Regel 4.17 Ziffer iii) für alle Bestimmungsstaaten
- hinsichtlich der Berechtigung des Anmelders, die Priorität einer früheren Anmeldung zu beanspruchen (Regel 4.17 Ziffer iii) für alle Bestimmungsstaaten
- Erfindererklärung (Regel 4.17 Ziffer iv) nur für US
- Erfindererklärung (Regel 4.17 Ziffer iv) nur für US

Veröffentlicht:

- mit internationalem Recherchenbericht
- vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eintreffen

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(57) **Zusammenfassung:** Ein Mikroskop mit einem ersten und einem zweiten Beleuchtungslichtstrahl (3, 38) zum Beleuchten einer Probe (25) ist dadurch gekennzeichnet, dass der erste und/oder der zweite Beleuchtungslichtstrahl (3, 33) die Probe (25) evaneszent beleuchtet. Zur CARS-Untersuchung kann der erste Beleuchtungslichtstrahl ein Pumplichtstrahl (43) und der zweite Beleuchtungslichtstrahl ein Stokeslichtstrahl (45) sein. Zur Erzielung einer Auflösungssteigerung kann der erste Beleuchtungslichtstrahl ein Anregungs- und der zweite Beleuchtungslichtstrahl ein Stimulationslichtstrahl sein.

Mikroskop mit evaneszenter Beleuchtung

Die Erfindung betrifft ein Mikroskop mit einem ersten und einem zweiten Beleuchtungslichtstrahl zum Beleuchten einer Probe.

- 5 Die Erfindung betrifft außerdem ein Verfahren zur – insbesondere mikroskopischen -Untersuchung einer Probe.

- Aus US 2002/0097489 A1 ist ein Mikroskop mit evaneszenter Beleuchtung einer Probe bekannt. Das Mikroskop beinhaltet eine Weißlichtquelle, deren Licht über eine Schlitzblende durch das Mikroskopobjektiv hindurch in den
- 10 eine Probe tragenden Objektträger zur evaneszenten Beleuchtung eingekoppelt wird. Das Beleuchtungslicht pflanzt sich in dem Objektträger durch totalinterne Reflektion fort, wobei die Beleuchtung der Probe nur im Bereich des aus dem Objektträger herausragenden evaneszenten Feldes erfolgt. Mikroskope dieser Art sind unter dem Begriff TIRFM (Total Internal
- 15 Reflection Fluorescent Microscope) bekannt.

Die z-Auflösung von TIRF-Mikroskopen ist aufgrund des nur ca. 100 nm in die Probe ragenden evaneszenten Feldes außerordentlich gut.

Aus DE 101 08 796 A1 ist ein hochaperturiges Objektiv, insbesondere für TIRF-Anwendungen bekannt. Das Objektiv besteht aus einer ersten Linse mit

einer positiven Brechkraft, einer zweiten Linse mit negativer Brechkraft, wobei das Brennweitenverhältnis zwischen den beiden Linsen im Bereich von - 0,4 und - 0,1 liegt und die Gesamtbrechkraft größer Null ist. Ferner beinhaltet das Objektiv zwei positive Linsen, deren Verhältnisdurchmesser zur Brennweite
5 größer 0,3 und kleiner 0,6 ist. Ferner beinhaltet das Objektiv eine Negativlinse und einer Sammellinse, wobei die Negativlinse der Frontgruppe zugewandt ist und das Brennweitenverhältnis der Negativlinse und der Sammellinse zwischen - 0,5 und - 2 liegt.

Aus DE 102 17 098 A1 ist eine Auflichtbeleuchtungsanordnung für die TIRF-
10 Mikroskopie bekannt. Die Auflichtbeleuchtungsanordnung beinhaltet eine Beleuchtungsquelle, die im Betrieb ein polarisiertes Beleuchtungsstrahlenbündel abgibt, das unter einem Winkel zur optischen Achse propagiert und eine Umlenkeinrichtung, die das Beleuchtungsstrahlenbündel umlenkt und parallel zur optischen Achse in das
15 Objektiv einkoppelt. Es ist bei dieser Auflichtbeleuchtungsanordnung vorgesehen, dass das von der Beleuchtungsquelle abgegebene Beleuchtungsstrahlenbündel s- und p-Polarisationsrichtungen mit einer Phasendifferenz aufweist und die Umlenkeinrichtung das Beleuchtungsstrahlenbündel x-mal reflektiert, wobei $x = (n \times 180^\circ - d)/60^\circ$.

20 Aus DE 101 43 481 A1 ist ein Mikroskop zur TIRM (Total Internal Reflection Microscopy) bekannt. Das Mikroskop weist ein Mikroskopgehäuse und ein Objektiv auf. Das von einer Beleuchtungseinrichtung ausgehende Beleuchtungslicht kann über einen in das Mikroskopgehäuse einschiebbaren Adapter eingekoppelt werden.

25 Aus US 2004/0001253 A1 ist ein Mikroskop mit einem optischen Beleuchtungssystem, das ein einfaches Umschalten zwischen evaneszenter Beleuchtung und Reflektionsbeleuchtung ermöglicht. Das Beleuchtungssystem beinhaltet eine Laserlichtquelle, deren Licht in eine optische Faser eingekoppelt wird. Ferner ist eine Auskoppeloptik vorgesehen,
30 die das aus der Faser austretende Licht in einen hinteren Brennpunkt des Mikroskopobjektivs fokussiert. Die optische Faser ist in einer Ebene senkrecht zur optischen Achse des Mikroskopobjektivs verschiebbar.

Aus DE 102 29 935 A1 ist eine Einrichtung zur Einkopplung von Licht in einem Mikroskop bekannt. Dabei wird in der Leuchtfeldblendenebene durch eine als Schieber ausgeführte Lichtleitfaser-Einkopplung Laserlicht auf das Präparat
5 gerichtet. Die Erfindung ist insbesondere für das TIRF-Verfahren geeignet.

In der Rastermikroskopie wird eine Probe mit einem Lichtstrahl beleuchtet, um das von der Probe emittierte Detektionslicht, als Reflexions- oder Fluoreszenzlicht, zu beobachten. Der Fokus eines Beleuchtungslichtstrahlenbündels wird mit Hilfe einer steuerbaren
10 Strahlablenkeinrichtung, im Allgemeinen durch Verkippen zweier Spiegel, in einer Probenebene bewegt, wobei die Ablenkachsen meist senkrecht aufeinander stehen, so dass ein Spiegel in x-, der andere in y-Richtung ablenkt. Die Verkipfung der Spiegel wird beispielsweise mit Hilfe von Galvanometer-Stellelementen bewerkstelligt. Die Leistung des vom Objekt
15 kommenden Detektionslichtes wird in Abhängigkeit von der Position des Abtaststrahles gemessen. Üblicherweise werden die Stellelemente mit Sensoren zur Ermittlung der aktuellen Spiegelstellung ausgerüstet. Speziell in der konfokalen Rastermikroskopie wird ein Objekt mit dem Fokus eines Lichtstrahls in drei Dimensionen abgetastet.

20 Ein konfokales Rastermikroskop umfasst im Allgemeinen eine Lichtquelle, eine Fokussieroptik, mit der das Licht der Quelle auf eine Lochblende – die sog. Anregungsblende - fokussiert wird, einen Strahlteiler, eine Strahlablenkeinrichtung zur Strahlsteuerung, eine Mikroskopoptik, eine Detektionsblende und die Detektoren zum Nachweis des Detektions- bzw.
25 Fluoreszenzlichtes. Das Beleuchtungslicht wird über einen Strahlteiler eingekoppelt. Das vom Objekt kommende Fluoreszenz- oder Reflexionslicht gelangt über die Strahlablenkeinrichtung zurück zum Strahlteiler, passiert diesen, um anschließend auf die Detektionsblende fokussiert zu werden, hinter der sich die Detektoren befinden. Diese Detektionsanordnung wird
30 Descan-Anordnung genannt. Detektionslicht, das nicht direkt aus der Fokusregion stammt, nimmt einen anderen Lichtweg und passiert die Detektionsblende nicht, so dass man eine Punktinformation erhält, die durch

sequentielles Abtasten des Objekts mit dem Fokus des Beleuchtungslichtstrahlenbündels zu einem dreidimensionalen Bild führt. Meist wird ein dreidimensionales Bild durch schichtweise Bilddatennahme erzielt.

- 5 Anordnungen, die das Auflösungsvermögen eines konfokalen Rastermikroskops ist unter anderem durch die Intensitätsverteilung und die räumliche Ausdehnung des Fokus des Anregungslichtstrahls gegeben. Eine Anordnung zur Steigerung des Auflösungsvermögens für Fluoreszenzanwendungen ist aus der PCT/DE/95/00124 bekannt. Hierbei
- 10 werden die lateralen Randbereiche des Fokusvolumens des Anregungslichtstrahls mit einem Lichtstrahl einer anderen Wellenlänge, dem sog. Stimulationslichtstrahl, der von einem zweiten Laser emittiert wird, beleuchtet, um dort die vom Licht des ersten Lasers angeregten Probenbereiche stimuliert in den Grundzustand zurück zu bringen. Detektiert
- 15 wird dann nur das spontan emittierte Licht aus den nicht vom zweiten Laser beleuchteten Bereichen, so daß insgesamt eine Auflösungsverbesserung erreicht wird. Für dieses Verfahren hat sich die Bezeichnung STED (Stimulated Emission Depletion) eingebürgert.

- Beispielsweise aus US 2002/0167724 A1 und aus US 6,667,830 B1 ist eine
- 20 Variante der STED-Technik bekannt, bei der die vom Licht des ersten Lasers angeregten Probenbereiche mit dem Licht des zweiten Lasers zunächst weiter – nämlich in einen dritten Zustand – angeregt werden. Bei dieser Variante, für die sich auch der Begriff „up-conversion“ eingebürgert hat, wird äquivalent zu der Variante der direkten stimulierten Abregung in den Grundzustand eine
- 25 Auflösungssteigerung erzielt.

Coherent anti-Stokes Raman scattering (CARS)-Mikroskopie ist eine Technik, die zunehmend an Bedeutung gewinnt. Ein großer Vorteil ist, dass die Proben nicht mit Farbstoffen markiert werden müssen. Außerdem können lebende Zellen untersucht werden.

- 30 Im Vergleich zur herkömmlichen Raman-Mikroskopie und der bekannten konfokalen Raman-Mikroskopie kann man bei der CARS-Mikroskopie eine

höhere Ausbeute an Detektionslicht erzielen, störende Nebeneffekte besser unterdrücken und das Detektionslicht leichter vom Beleuchtungslicht trennen. Für die konventionelle konfokale Raman-Spektroskopie wird ein Detektionspinhole benötigt, um eine gute axiale Auflösung zu erreichen, sowie
5 ein hochauflösendes Spektrometer. CARS dagegen ist ein nichtlinearer optischer Prozess (Vierwellen-Mischprozess). Ähnlich, wie bei der Multiphotonen-Mikroskopie, bei der zwei oder mehr Photonen gleichzeitig absorbiert werden, wird, da die Wahrscheinlichkeit des Phasenrichtigen gleichzeitigen Zusammentreffens mehrerer Photonen im Fokus auf Grund der
10 höheren Photonendichte am größten ist, kein Detektionspinhole benötigt. Ohne Detektionspinhole wird die gleiche axiale Auflösung erzielt wie bei der Multiphotonen-Mikroskopie. Für die CARS-Spektroskopie werden üblicherweise 2 Laser, die Licht unterschiedlicher Wellenlängen emittieren (ν_P und ν_S , Pump- und Stokeslaser), benutzt, wobei ν_S durchstimmbar sein sollte,
15 um ein CARS-Spektrum ν_{CARS} zu erzeugen ($\nu_{CARS} = 2\nu_P - \nu_S$, $I_{CARS} \sim (I_P)^2 \cdot I_S$). Stimmt die Differenzfrequenz $\nu_P - \nu_S$ mit der Differenzfrequenz zwischen zwei molekularen Vibrationszuständen $|1\rangle$ und $|0\rangle$ in der Probe überein, so ist das CARS-Signal sogar noch verstärkt. Der Pumplichtstrahl und der Stokeslichtstrahl werden bei mikroskopischen Anwendungen koaxial
20 vereinigt und gemeinsam auf dasselbe Probenvolumen fokussiert. Die Richtung, in der die Anti-Stokes-Strahlung emittiert wird, ergibt sich aus der Phasenanpassungsbedingung für den Vier-Wellen-Mischprozess.

Aus der US-Patentschrift 4,405,237 „Coherent anti-Stokes Raman device“ ist eine Vorrichtung bekannt, bei der zwei gepulste Laserstrahlen, die von zwei
25 Lasern erzeugt werden und die unterschiedliche Wellenlängen im sichtbaren Bereich oder im UV-Bereich des Spektrums aufweisen, genutzt werden, um eine Probe simultan zu beleuchten. Bei geeigneter Wahl der Wellenlängen kann die Probe derart angeregt werden, dass sie die charakteristische Coherent anti-Stokes Raman-Strahlung emittiert.

30 Aus James W.M. Chon, Min Gu, „Scanning total internal reflection fluorescence microscopy under one-photon and two-photon excitation: Image

formation", Appl. Opt. 43, 1063-1071, 2004 und aus
Florian Schapper, José T. Gonçalves, Martin Oheim, "Fluorescence imaging
with two-photon evanescent wave excitation", Eur. Biophys. J. 32, 635-643,
2003 ist bekannt eine evaneszent beleuchtete Probe über einen
5 Zweiphotonenprozess anzuregen.

Die bislang bekannten Techniken zur evaneszenten Probenbeleuchtung
erlauben lediglich die Probenschichten zu untersuchen, die direkt an das
Deckglas bzw. direkt an den Objektträger angrenzen.

Es ist die Aufgabe der vorliegenden Erfindung ein Mikroskop anzugeben, das
10 eine weitgehend flexible Probenuntersuchung, insbesondere auch der
Bereiche, die nicht unmittelbar an das Deckglas oder an den Objektträger
angrenzen, zu ermöglichen.

Diese Aufgabe wird durch ein Mikroskop gelöst, das dadurch gekennzeichnet
ist, dass der erste und/oder der zweite Beleuchtungslichtstrahl die Probe
15 evaneszent beleuchtet.

Es ist eine weitere Aufgabe der vorliegenden Erfindung ein Verfahren zur -
insbesondere rastermikroskopischen - Untersuchung einer Probe anzugeben,
die weitgehend flexibel ist und sich nicht auf die Probenschichten beschränkt,
die unmittelbar an das Deckglas bzw. an den Objektträger angrenzen.

20 Die weitere Aufgabe wird durch ein Verfahren zur – insbesondere
mikroskopischen -Untersuchung einer Probe mit folgenden Schritten gelöst:

- Erzeugen eines ersten und eines zweiten Beleuchtungslichtstrahls
- Beleuchten der Probe mit dem ersten und dem zweiten
Beleuchtungslichtstrahl, wobei zumindest der erste
25 Beleuchtungslichtstrahl die Probe evaneszent beleuchtet.

In einer besonders bevorzugten Ausgestaltungsvariante weist das Mikroskop
ein Objektiv mit einer Objektivpupille auf, wobei der erste und/oder der zweite
Beleuchtungslichtstrahlenbündel im Bereich der Objektivpupille einen Fokus
30 aufweist. Vorzugsweise ist ein Einstellmittel vorgesehen, mit dem die

räumliche Position des Fokus innerhalb der Ebene der Objektivpupille veränderbar ist. Das Einstellmittel kann beispielsweise eine Strahlableitvorrichtung mit mehreren Dreh- oder Kippspiegeln oder mit einem kardanisch aufgehängten Spiegel umfassen. Das Einstellmittel kann auch als
5 akustooptisches Element ausgebildet sein oder Mikrospiegel beinhalten. Zum Einstellen der räumlichen Position des Fokus des ersten und/oder des zweiten Beleuchtungslichtstrahlenbündels kann auch eine verschiebbare Lichtleitfaser dienen.

Der Winkel bezüglich der optischen Achse des Objektivs, unter dem der zur
10 evaneszenten Beleuchtung der Probe vorgesehene Beleuchtungslichtstrahlenbündel das Objektiv verlässt, hängt von der räumlichen Position des Fokus in der Objektivpupille ab. Der Winkel ist umso größer, je größer der Abstand des jeweiligen Fokus von der optischen Achse ist. Daher ist erfindungsgemäß insbesondere der Abstand des Fokus von der
15 optischen Achse des Objektivs zur Einstellung des Winkels und damit zur Einstellung der Eindringtiefe des evaneszenten Feldes in die Probe einstellbar.

In einer bevorzugten Ausgestaltungsform des erfindungsgemäßen Rastermikroskops ist um eine CARS-Untersuchung einer Probe zu realisieren.
20 Der erste Beleuchtungslichtstrahlenbündel, ein Pumplichtstrahl und der zweite Beleuchtungslichtstrahlenbündel, ein Stokeslichtstrahl.

In einer anderen, ganz besonders bevorzugten Ausgestaltungsform des erfindungsgemäßen Rastermikroskops ist insbesondere zur Erzielung einer hohen Ortsauflösung das erste Beleuchtungslichtstrahlenbündel ein
25 Anregungslichtstrahlenbündel zur optischen Anregung eines ersten Probenbereichs und der zweite Beleuchtungslichtstrahlenbündel ein Stimulationslichtstrahlenbündel zum Auslösen einer stimulierten Emission oder zum Auslösen einer weiteren Anregung, wobei die stimulierte Emission und/oder die weitere Anregung in einem weiteren zumindest teilweise mit dem
30 ersten Probenbereich überlappenden Probenbereich stattfindet.

Besonders bevorzugt ist eine Variante, bei der das

Anregungslichtstrahlenbündel und das Stimulationslichtstrahlenbündel beide die Probe evaneszent beleuchten, wobei das Anregungslichtstrahlenbündel eine größere Eindringtiefe aufweist als das Stimulationslichtstrahlenbündel. Um dies zu realisieren, wird der Abstand des Fokus des Anregungslichtstrahlenbündels in der Objektivpupille von der optischen Achse des Objektivs größer gewählt, als der Abstand des Fokus des Stimulationslichtstrahlenbündels in der Objektivpupille von der optischen Achse. Durch den relativ tiefer eindringenden Anregungslichtstrahlenbündel wird die Probe in einer an das Deckglas bzw. an den Objekträger angrenzenden relativ breiten Schicht optisch angeregt und durch den Stimulationslichtstrahl in einer relativ schmalen, an den Objekträger bzw. an das Deckglas angrenzenden –mit der ersten Schicht überlappenden– Schicht stimuliert, optisch abgeregt, so dass letztlich weitgehend ausschließlich Fluoreszenzphotonen aus dem Teil der mit dem Anregungslichtstrahlenbündel beleuchteten Schicht detektiert werden, die nicht von dem Stimulationslichtstrahlenbündel beleuchteten Schicht räumlich überlagert ist.

In einer anderen erfindungsgemäßen Variante wird die Probe von dem Anregungslichtstrahlenbündel evaneszent beleuchtet und von dem direkt beleuchteten Stimulationslichtstrahlenbündel optisch stimuliert abgeregt. Das Stimulationslichtstrahlenbündel ist hierbei vorzugsweise derart manipuliert, dass der Fokus des Stimulationslichtstrahlenbündels innen hohl ausgebildet ist. Ein Hohlfokus ist beispielsweise mit Hilfe von Phasenfiltern, die in einer zur Fokalebene des Objektivs konjugierten Ebene (Fourierebene) angeordnet sind. Als Phasenfilter kann beispielsweise eine $\lambda/2$ -Platte fungieren, die von dem Stimulationslichtstrahl überleuchtet wird, so dass nur der innere Teilbereich des Stimulationslichtstrahlenbündels durch die $\lambda/2$ -Platte verläuft, während der äußere Ring an der $\lambda/2$ -Platte vorbei verläuft. Letztlich werden die Fluoreszenzphotonen detektiert, die aus dem vom Anregungslichtstrahlenbündel evaneszent beleuchteten Teilbereich der Probe stammen, der im inneren des Hohlfokus des Stimulationslichtstrahlenbündels liegt. Auf diese Weise kann eine Abrasterung der Probe mit einer sehr hohen Ortsauflösung erfolgen. In z-Richtung ist die Ortsauflösung durch die

Eindringtiefe des evaneszent beleuchteten Anregungslichtstrahls gegeben (z.B. 100 nm), während in den axialen Richtungen das Auflösungsvermögen durch die Abmessungen des Hohlfokus bestimmt sind. Zum Abrastern der Probe wird der Fokus des Stimulationslichtstrahlenbündels vorzugsweise mit
5 einer Strahlableitvorrichtung, vorzugsweise mäanderförmig über bzw. durch die Probe geführt.

In einer besonderen Ausgestaltungsvariante erfolgt durch das Stimulationslichtstrahlenbündel eine weitere Anregung der bereits angeregten Probenbereiche in einem dritten Anregungszustand. Auch diese Variante ist
10 geeignet, um eine hohe Ortsauflösung zu erzielen.

Vorzugsweise ist das erste Beleuchtungslichtstrahlenbündel und/oder das zweite Beleuchtungslichtstrahlenbündel zeitlich gepulst. Hierzu kann beispielsweise zumindest eine gepulste Lichtquelle, wie ein modemverkuppelter Puls laser (z.B. Titansaphirlaser) vorgesehen sein. Auch
15 die Verwendung von gepulsten Halbleiterlasern oder von regenerativen Verstärkern ist beispielsweise möglich.

Von besonderem Vorteil ist eine Ausgestaltungsform, bei der das erste Beleuchtungslichtstrahlenbündel und das zweite Beleuchtungslichtstrahlenbündel zeitlich gepulst sind, wobei der zeitliche
20 Abstand der Pulse des ersten Beleuchtungslichtstrahlenbündels zu den Pulsen des zweiten Beleuchtungslichtstrahlenbündels einstellbar ist. In dieser Variante können beispielsweise zwei Lichtquellen aufeinander synchronisiert sein, wobei der zeitliche Abstand der Pulse durch einstellbare Verzögerungsstrecken einstellbar ist. In einer anderen Variante kann auch das
25 Licht des ersten Beleuchtungslichtstrahlenbündels und das Licht des zweiten Beleuchtungslichtstrahlenbündels von einer einzigen Lichtquelle entstammen, die einen aufzuteilenden Primärlichtstrahl emittiert, wobei vorgesehen sein kann, dass in den aufgeteilten Lichtzweigen eine Wellenlängenveränderung (OPO; mikrostrukturierte Faser; Frequenzvervielfachung) oder eine
30 Leistungsveränderung (z.B. Verstärker oder Abschwächer) erfolgt.

Das erfindungsgemäße Mikroskop weist vorzugsweise zumindest eine

- Mehrlinienlichtquelle und/oder zumindest eine Breitbandlichtquelle auf. Vorzugsweise sind die Wellenlängen bzw. ist die Wellenlänge des ersten Beleuchtungslichtstrahlenbündels und/oder des zweiten Beleuchtungslichtstrahlenbündels einstellbar. Es ist erfindungsgemäß
- 5 möglich, dass der erste Beleuchtungslichtstrahlenbündel und auch der zweite Beleuchtungslichtstrahlenbündel Licht einer oder mehrerer Wellenlängen beinhalten kann, wobei sich die Wellenlängen des ersten Beleuchtungslichtstrahlenbündels und des zweiten Beleuchtungslichtstrahlenbündels voneinander unterscheiden können.
- 10 In einer besonders bevorzugten Variante ist der Durchmesser des ersten Beleuchtungslichtstrahlenbündels und/oder des zweiten Beleuchtungslichtstrahlenbündels einstellbar. Insbesondere ist es von Vorteil, wenn der Öffnungswinkel des zu einem in der Objektivpupille liegenden Fokus zusammenlaufenden Beleuchtungslichtstrahlenbündels einstellbar ist. Durch
- 15 Änderung des Öffnungswinkels bei der Fokussierung in die Objektivpupille ändert sich die Größe der Fläche, die evaneszent beleuchtet wird. Wählt man die Fläche der durch den Stimulationslichtstrahl evaneszent beleuchteten Fläche so, dass sie kleiner ist als die von dem evaneszent anregenden Beleuchtungslichtstrahlenbündel beleuchtete Fläche, so kann man einen
- 20 direkten Vergleich der Fluoreszenzeigenschaften von Probenschichten in unmittelbarer Nähe der Objektträgeroberfläche zu den Fluoreszenzeigenschaften von Probenschichten in tiefergelegenen Schichten erhalten.
- Bei einer vorteilhaften Variante wird die Probe mit einer evaneszenten
- 25 Anregungs-Beleuchtung mit einer relativ hohen Eindringtiefe beleuchtet werden. Mit einer evaneszenten STED-Beleuchtung (Stimulationslichtstrahlenbündel), die eine geringe Eindringtiefe aufweist (größerer Eintrittswinkel in den Objektträger), wird eine Fluoreszenz direkt am Objektträger stimuliert abgeregt. Die Aufnahme des Fluoreszenzbildes erfolgt
- 30 zeitlich später (time-gated CCD), so dass nur Fluoreszenzphotonen aus tiefer liegenden Probenschichten detektiert werden. Die Einstellung der jeweiligen Tiefen sind sogar einstellbar, indem die radialen Positionen der beiden

Beleuchtungslichtfokusse in der Objektivpupille variiert werden. Die Beleuchtungslichtintensität in der Probe nimmt bei TIRF exponentiell mit der Eindringtiefe ab. Umso effektiver ist der STED-Effekt direkt an der Objektträgeroberfläche, so dass z.B. Probenschichten ab 100nm Tiefe
5 vermessen werden können.

Vorzugsweise sind vor dem Detektor (beispielsweise Multibanddetektor), der beispielsweise als Kamera ausgestaltet sein kann, Bandpassfilter und/oder Kantenfilter angeordnet auf die jeweilige Emissionsbandbreite des Fluoreszenzsignals durch abgestimmt sind. Zur Farbselektion kann ein
10 dispersives Element vorgesehen sein, dass eine spektrale Aufspaltung erzeugt, aus der die zu detektierenden Wellenlängenanteile ausgeblendet werden. Der Detektor kann auch als Farbdetektor, beispielsweise als Farbkamera ausgestaltet sein. Genauso ist es möglich, dass ein dispersives Element das Detektionslicht auf mehrere Detektoren aufteilt, um eine
15 Spektraldetektion zu erreichen.

In einer ganz besonders bevorzugten Ausführungsform umfasst das Mikroskop ein Rastermikroskop; insbesondere ein konfokales Rastermikroskop.

In der Zeichnung ist der Erfindungsgegenstand schematisch dargestellt und
20 wird anhand der Figuren nachfolgend beschrieben, wobei gleich wirkende Elemente mit denselben Bezugszeichen versehen sind. Dabei zeigen:

Fig. 1 Ein erfindungsgemäßes Mikroskop und

Fig. 2 Eine Detailansicht eines erfindungsgemäßen Mikroskops zur Erläuterung eines erfindungsgemäßen Verfahrens.

25

Fig. 1 zeigt ein erfindungsgemäßes Mikroskop mit einer ersten Lichtquelle 1, die ein erstes Beleuchtungslichtstrahlenbündel 3 erzeugt. Das erste Beleuchtungslichtstrahlenbündel gelangt zu einer ersten Strahlableitvorrichtung 5, die einen kardanisich aufgehängten Drehspiegel 7
30 beinhaltet und wird von dieser Strahlableitvorrichtung zu einer ersten Optik 9,

einer zweiten Optik 11 und einer dritten Optik 13 geführt und von einem Strahlteiler 15, der als dichroitischer Strahlteiler 17 ausgeführt ist, zu dem Mikroskopobjektiv 19 gelenkt. Das Mikroskopobjektiv 19 weist eine hintere Brennebene (Objektivpupillenebene 21) auf. Das erste

5 Beleuchtungslichtstrahlenbündel 3 weist in der Objektivpupillenebene 21 einen als Punkt dargestellten Fokus 23 auf. Das Beleuchtungslichtstrahlenbündel 3 wird zur evaneszenten Beleuchtung der Probe 25 in einen Objektträger 27 eingekoppelt. Zwischen dem Objektträger und dem Objektiv 19 befindet sich ein Immersionsmittel 29. Das Mikroskop

10 weist eine zweite Lichtquelle 31, die ein zweites Beleuchtungslichtstrahlenbündel 33 emittiert auf. Das zweite Beleuchtungslichtstrahlenbündel 33 gelangt über eine zweite Strahlableinrichtung 35, die einen zweiten kardanisch aufgehängten Drehspiegel 37 beinhaltet, zur ersten Optik 9, zur zweiten Optik 11 und zur

15 dritten Optik 13 und wird von dem Strahlteiler 15 zum Mikroskopobjektiv 19 gelenkt. Das zweite Beleuchtungslichtstrahlenbündel 33 weist in der Objektivpupillenebene einen Fokus 39 auf. Das zweite Beleuchtungslichtstrahlenbündel 33 wird ebenfalls zur evaneszenten Probenbeleuchtung in den Objektträger 27 eingekoppelt. Das erste

20 Beleuchtungslichtstrahlenbündel verlässt das Mikroskopobjektiv 19 unter einem Winkel α zur optischen Achse 41 des Objektivs 19, während das zweite Beleuchtungslichtstrahlenbündel 33 das Objektiv 19 unter einem Winkel β verlässt. Der Winkel α ist durch Verändern des Abstandes des ersten Fokus 23, des ersten Beleuchtungslichtstrahlenbündels 3 zur optischen Achse 41

25 des Objektivs 19 einstellbar. Analog ist der Winkel β durch Verändern des Abstandes des zweiten Fokus 39 von der optischen Achse 41 einstellbar. Die Einstellung der Position des ersten Fokus 23 und des zweiten Fokus 39 erfolgt mit Hilfe der ersten Strahlableinrichtung 5 bzw. mit Hilfe der zweiten Strahlableinrichtung 35, die vorzugsweise jeweils in einer zur

30 Objektivpupillenebene 21 korrespondierenden Ebene angeordnet sind. Da die Eindringtiefe der evaneszenten Beleuchtung direkt vom Winkel α bzw. vom Winkel β abhängt, kann mit Hilfe der ersten Strahlableinrichtung 5 bzw. mit

Hilfe der zweiten Strahlableitvorrichtung 35 die jeweilige Eindringtiefe des ersten Beleuchtungslichtstrahlenbündels 3 und des zweiten Beleuchtungslichtstrahlenbündels 33 eingestellt werden.

In dieser Ausgestaltungsvariante ist das erste
5 Beleuchtungslichtstrahlenbündel 3 ein Anregungslichtstrahlenbündel 43, während das zweite Beleuchtungslichtstrahlenbündel 33 ein Stimulationsstrahlenbündel 45 ist. Das Anregungslichtstrahlenbündel 43 regt einen ersten schichthaften Probenbereich der Probe 25 an. Das Stimulationslichtstrahlenbündel 45 weist Licht einer Wellenlänge auf, die zum
10 Auslösen einer stimulierten Emission angeregter Probenmoleküle geeignet ist. Die Eindringtiefe des evaneszenten Stimulationsbeleuchtungslichtes ist in dieser Variante geringer als die Eindringtiefe des evaneszenten Anregungsbeleuchtungslichtes. Die erste Lichtquelle 1 ist als gepulster Titansaphirlaser 47 ausgeführt. Die zweite Lichtquelle 31 ist ebenfalls gepulst
15 und beinhaltet einen nicht gezeigten Titansaphirlaser, der einen nicht gezeigten OPO (Optisch parametrischen Oszillator) speist. Die erste Lichtquelle 1 und die zweite Lichtquelle 31 sind derart aufeinander synchronisiert, dass zunächst mit einem Puls des Anregungslichtstrahlenbündels 3 eine Probenanregung erfolgt und
20 anschließend mit dem Licht des Stimulationslichtstrahlenbündels 31 in einer mit der Anregungsschicht überlappenden Probenschicht eine stimulierte Emission ausgelöst wird. Letztlich detektiert werden von dem Detektor 51, der als CCD-Kamera 53 ausgeführt ist, die Fluoreszenzphotonen, die aus dem nicht von dem Licht des Stimulationslichtstrahlenbündels 31 beaufschlagten
25 Anregungsbereich des Anregungslichtstrahlenbündels 3 stammen. Das aus diesem Bereich stammende Detektionslicht 55 gelangt durch das Mikroskopobjektiv 19 zu dem Strahlteiler 15, passiert diesen, um anschließend auf die CCD-Kamera 53 zu treffen.

Fig 2 zeigt eine Detailansicht eines erfindungsgemäßen Mikroskops zur
30 Ausführung des erfindungsgemäßen Verfahrens. Ein erstes Beleuchtungslichtstrahlenbündel 3, das ein Anregungslichtstrahlenbündel 43 ist, ist zu einem ersten Fokus 23 fokussiert. Nach Durchlaufen des

Mikroskopobjektivs 19 (gestrichelt angedeutet) verlässt das Anregungslichtstrahlenbündel das Objektiv als Parallelstrahlenbündel und wird zur evaneszenten Probenbeleuchtung in einen Objektträger 27 eingekoppelt. Ein zweites Beleuchtungslichtstrahlenbündel 33, das ein

5 Stimationslichtstrahlenbündel 45 ist, wird zu einem zweiten in der Objektivpupillenebene 21 liegenden zweiten Fokus 39 fokussiert. Nach Durchlaufen des Objektivs 19 (gestrichelt angedeutet) verlässt das Stimationslichtstrahlenbündel 45 als Parallelstrahlenbündel. Das Anregungslichtstrahlenbündel 43 verlässt das Objektiv 19 unter einem

10 größeren Winkel zur optischen Achse des Objektivs als das Stimationslichtstrahlenbündel 45; demgemäss ist die Eindringtiefe des Lichtes des Anregungslichtstrahlenbündels 43 in die Probe 25 größer als die Eindringtiefe des Lichtes des Stimationslichtstrahlenbündels 45. Der zu dem ersten Fokus 23 des Anregungslichtstrahlenbündels 43 zusammenlaufende

15 Lichtkegel weist einen Öffnungswinkel φ_1 auf, während der zu dem zweiten Fokus 39 zusammenlaufende Lichtkegel des Stimationslichtstrahlenbündels 45 einen Öffnungswinkel φ_2 aufweist, der kleiner als φ_1 ist; folglich ist der Durchmesser des das Objektiv 19 verlassenden Anregungslichtstrahlenbündels größer als der Durchmesser des das Objektiv

20 19 verlassenden Stimationslichtstrahlenbündels 45. Demgemäss ist die von dem Anregungslichtstrahlenbündel 43 evaneszent beleuchtete axiale Fläche der Probe 25 größer als die von dem Stimationslichtstrahlenbündel 45 evaneszent beleuchtete Probenfläche. Mit dieser Anordnung ist es möglich, Vergleiche der Fluoreszenzeigenschaften von Probenschichten in

25 unmittelbarer Nähe des Objektträgers 27 und tiefer gelegener Schichten zu ziehen. Der von dem Anregungslichtstrahlenbündel 43 evaneszent beleuchtete erste Probenbereich 57 wird von dem Licht des Anregungslichtstrahlenbündels 43 optisch angeregt (schraffiert eingezeichnet). Der von dem Stimationslichtstrahlenbündel 45 evaneszente

30 zweite Probenbereich 59 ist kleiner als der erste Probenbereich 57 und überlappt zumindest teilweise mit diesem. In diesem zweiten Probenbereich 59 wird eine stimulierte Emission ausgelöst und erst danach die spontan emittierten Photonen mit dem nicht gezeigten (gegateten) Detektor detektiert.

Die detektierten Photonen stammen im wesentlichen aus dem Teil des ersten Probenbereichs 57, der nicht mit dem zweiten Probenbereich 59 überlappt.

- Die Erfindung wurde in Bezug auf eine besondere Ausführungsform beschrieben. Es ist jedoch selbstverständlich, dass Änderungen und
- 5 Abwandlungen durchgeführt werden können, ohne dabei den Schutzbereich der nachstehenden Ansprüche zu verlassen.

Bezugszeichenliste:

	1	erste Lichtquelle
	3	erstes Beleuchtungslichtstrahlenbündel
5	5	erste Strahlableinrichtung
	7	kardanisch aufgehängter Drehspiegel
	9	erste Optik
	11	zweite Optik
	13	dritte Optik
10	15	Strahlteiler
	17	dichroitischer Strahlteiler
	19	Mikroskopobjektiv
	21	Objektivpupillenebene
	23	Fokus
15	25	Probe
	27	Objektträger
	29	Immersionsmittel
	31	zweite Lichtquelle
	33	zweites Beleuchtungslichtstrahlenbündel
20	35	zweite Strahlableinrichtung
	37	zweiter kardanisch aufgehängter Drehspiegel
	39	Fokus
	41	optische Achse
	43	Anregungslichtstrahlenbündel
25	45	Stimulationsstrahlenbündel

	47	Titansaphirlaser
	51	Detektor
	53	Kamera
	55	Detektionslicht
5	57	erster Probenbereich
	59	zweiter Probenbereich

Patentansprüche

1. Mikroskop mit einem ersten und einem zweiten
Beleuchtungslichtstrahl zum Beleuchten einer Probe, dadurch
gekennzeichnet, dass der erste und/oder der zweite Beleuchtungslichtstrahl
5 die Probe evaneszent beleuchtet.
2. Mikroskop nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass das
Mikroskop ein Objektiv mit einer Objektivpupille aufweist, und dass der erste
Beleuchtungslichtstrahl und/oder der zweite Beleuchtungslichtstrahl im
Bereich der Objektivpupille einen Fokus aufweist.
- 10 3. Mikroskop nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass ein
Einstellmittel vorgesehen ist, mit dem die räumliche Position des Fokus
innerhalb der Ebene der Objektivpupille veränderbar ist.
4. Mikroskop nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass das
Einstellmittel eine im Strahlengang des Beleuchtungslichtstrahlenbündels
15 angeordnete einstellbare Strahlableitvorrichtung umfasst.
5. Mikroskop nach einem der Ansprüche 2 bis 4, dadurch
gekennzeichnet, dass der Abstand des Fokus von der optischen Achse des
Objektivs – insbesondere zur Einstellung der Eindringtiefe in die Probe bei
evaneszenter Beleuchtung - einstellbar ist.
- 20 6. Mikroskop nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch
gekennzeichnet, dass zur CARS-Untersuchung der erste
Beleuchtungslichtstrahl ein Pumplichtstrahl und der zweite
Beleuchtungslichtstrahl ein Stokeslichtstrahl ist.
7. Mikroskop nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch
25 gekennzeichnet, dass der erste Beleuchtungslichtstrahl ein
Anregungslichtstrahl zum optischen Anregen eines ersten Probenbereichs ist
und der zweite Beleuchtungslichtstrahl ein Stimulationslichtstrahl zum
Auslösen einer stimulierten Emission oder einer weiteren Anregung in einem
weiteren, zumindest teilweise mit dem ersten Probenbereich überlappenden

Probenbereich, ist.

8. Mikroskop nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, dass der Anregungslichtstrahl und der Stimulationslichtstrahl die Probe evaneszent beleuchten und dass der Anregungslichtstrahl eine größere Eindringtiefe aufweist, als der Stimulationslichtstrahl.
9. Mikroskop nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, dass der Abstand des Fokus des Anregungslichtstrahl von der optischen Achse des Objektivs größer ist, als der Abstand des Fokus Stimulationslichtstrahls von der optischen Achse.
10. Mikroskop nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, dass der erste Beleuchtungslichtstrahl und/oder der zweite Beleuchtungslichtstrahl zeitlich gepulst ist.
11. Mikroskop nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, dass der erste Beleuchtungslichtstrahl und der zweite Beleuchtungslichtstrahl zeitlich gepulst sind und dass die zeitliche Abstand der Pulse des ersten Beleuchtungslichtstrahls zu den Pulsen des zweiten Beleuchtungslichtstrahls einstellbar ist.
12. Mikroskop nach einem der Ansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, dass der Durchmesser des ersten Beleuchtungslichtstrahls und/oder des zweiten Beleuchtungslichtstrahls einstellbar ist.
13. Mikroskop nach einem der Ansprüche 1 bis 12, dadurch gekennzeichnet, dass das Mikroskop zumindest eine Mehrlinienlichtquelle und/oder zumindest eine Breitbandlichtquelle aufweist und die Wellenlänge bzw. die Wellenlängen des ersten Beleuchtungslichtstrahls und/oder des zweiten Beleuchtungslichtstrahls einstellbar ist.
14. Mikroskop nach einem der Ansprüche 1 bis 13, dadurch gekennzeichnet, dass das Mikroskop ein Rastermikroskop insbesondere ein konfokales Rastermikroskop ist.
15. Verfahren zur – insbesondere mikroskopischen -Untersuchung einer Probe mit folgenden Schritten:

- Erzeugen eines ersten und eines zweiten Beleuchtungslichtstrahls
 - Beleuchten der Probe mit dem ersten und dem zweiten Beleuchtungslichtstrahl, wobei zumindest der erste Beleuchtungslichtstrahl die Probe evaneszent beleuchtet.
- 5 16. Verfahren nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, dass die Beleuchtung durch das Objektiv eines Mikroskops erfolgt, wobei der erste Beleuchtungslichtstrahl und/oder der zweite Beleuchtungslichtstrahl im Bereich der Objektivpupille des Objektivs einen Fokus aufweist.
17. Verfahren nach Anspruch 16, gekennzeichnet durch den weiteren
- 10 Schritt:
- Einstellen der räumliche Position des Fokus des ersten und/oder des zweiten Beleuchtungslichtstrahls innerhalb der Ebene der Objektivpupille mit einem Einstellmittel.
18. Verfahren nach Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, dass das
- 15 Einstellmittel eine im Strahlengang des Beleuchtungslichtstrahlenbündels angeordnete einstellbare Strahlableinrichtung umfasst.
19. Verfahren nach einem der Ansprüche 16 bis 18, gekennzeichnet durch den Schritt:
- Einstellen der jeweiligen Eindringtiefe in die Probe bei evaneszenter
- 20 Beleuchtung durch Einstellen des jeweiligen Abstandes des Fokus von der optischen Achse des Objektivs.
20. Verfahren nach einem der Ansprüche 15 bis 19, dadurch gekennzeichnet, dass zur CARS-Untersuchung der erste Beleuchtungslichtstrahl ein Pumplichtstrahl und der zweite
- 25 Beleuchtungslichtstrahl ein Stokeslichtstrahl ist.
21. Verfahren nach einem der Ansprüche 15 bis 19, dadurch gekennzeichnet, dass der erste Beleuchtungslichtstrahl ein Anregungslichtstrahl zum optischen Anregen eines ersten Probenbereichs ist und der zweite Beleuchtungslichtstrahl ein Stimulationslichtstrahl zum
- 30 Auslösen einer stimulierten Emission oder einer weiteren Anregung in einem

weiteren, zumindest teilweise mit dem ersten Probenbereich überlappenden Probenbereich, ist.

22. Verfahren nach Anspruch 21, dadurch gekennzeichnet, dass der Anregungslichtstrahl und der Stimulationslichtstrahl die Probe evaneszent
5 beleuchten und dass der Anregungslichtstrahl eine größere Eindringtiefe aufweist, als der Stimulationslichtstrahl.

23. Verfahren nach Anspruch 21, dadurch gekennzeichnet, dass der Abstand des Fokus des Anregungslichtstrahl von der optischen Achse des Objektivs größer ist, als der Abstand des Fokus Stimulationslichtstrahls von
10 der optischen Achse.

24. Verfahren nach einem der Ansprüche 15 bis 23, dadurch gekennzeichnet, dass der erste Beleuchtungslichtstrahl und/oder der zweite Beleuchtungslichtstrahl zeitlich gepulst ist.

25. Verfahren nach Anspruch 24, dadurch gekennzeichnet, dass der
15 erste Beleuchtungslichtstrahl und der zweite Beleuchtungslichtstrahl zeitlich gepulst sind und dass die zeitliche Abstand der Pulse des ersten Beleuchtungslichtstrahls zu den Pulsen des zweiten Beleuchtungslichtstrahls eingestellt wird.

26. Verfahren nach einem der Ansprüche 15 bis 25, dadurch gekennzeichnet, dass der Durchmesser des ersten Beleuchtungslichtstrahls und/oder des zweiten Beleuchtungslichtstrahls eingestellt wird.
20

27. Verfahren nach einem der Ansprüche 15 bis 26, gekennzeichnet durch den weiteren Schritt:

- Einstellen der Wellenlänge bzw. der Wellenlängen des ersten
25 Beleuchtungslichtstrahls und/oder des zweiten Beleuchtungslichtstrahls.

28. Verfahren nach einem der Ansprüche 15 bis 27, gekennzeichnet durch die Verwendung eines Mikroskops, insbesondere eines Rastermikroskops oder eines konfokalen Rastermikroskops.

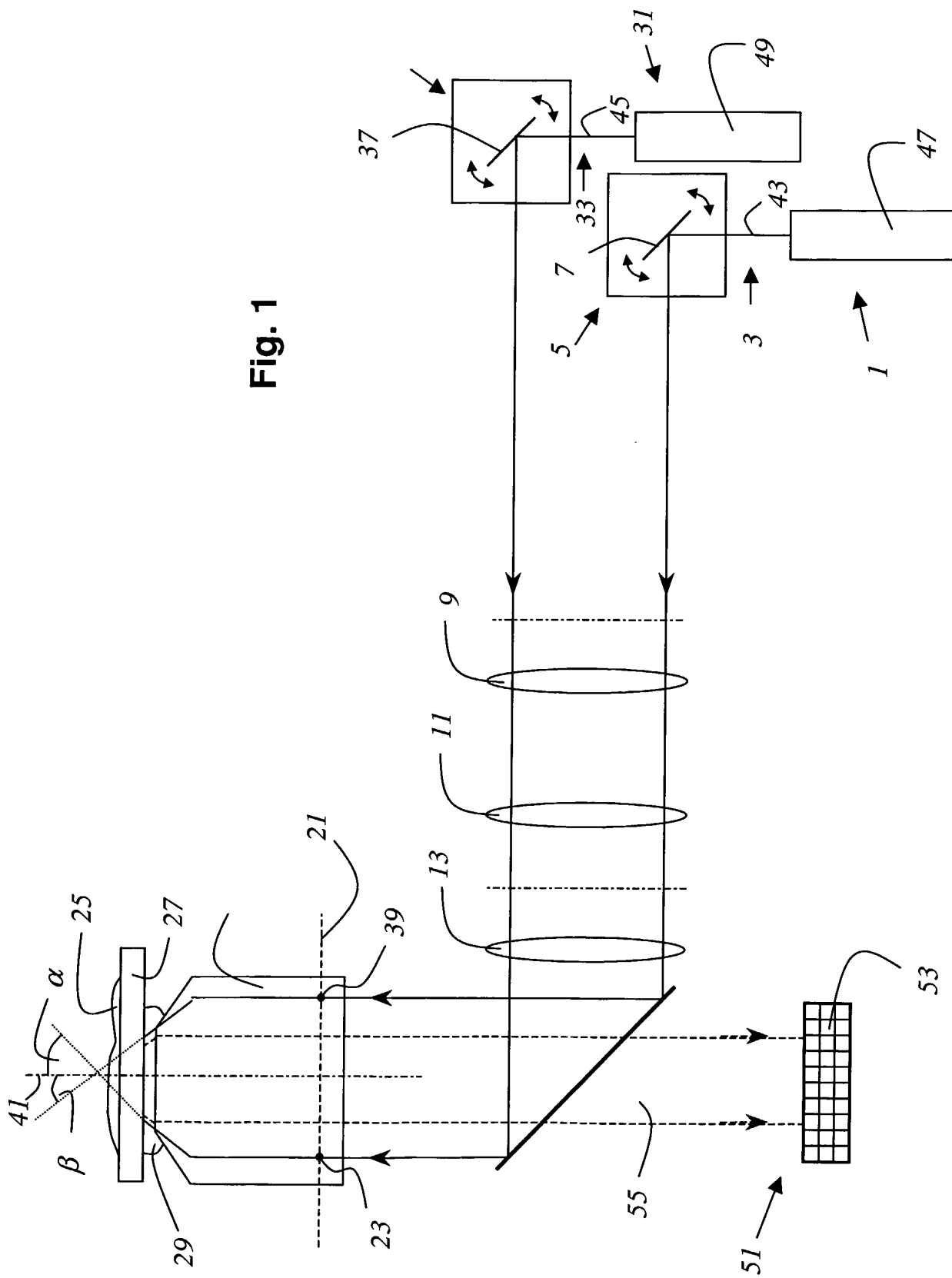


Fig. 1

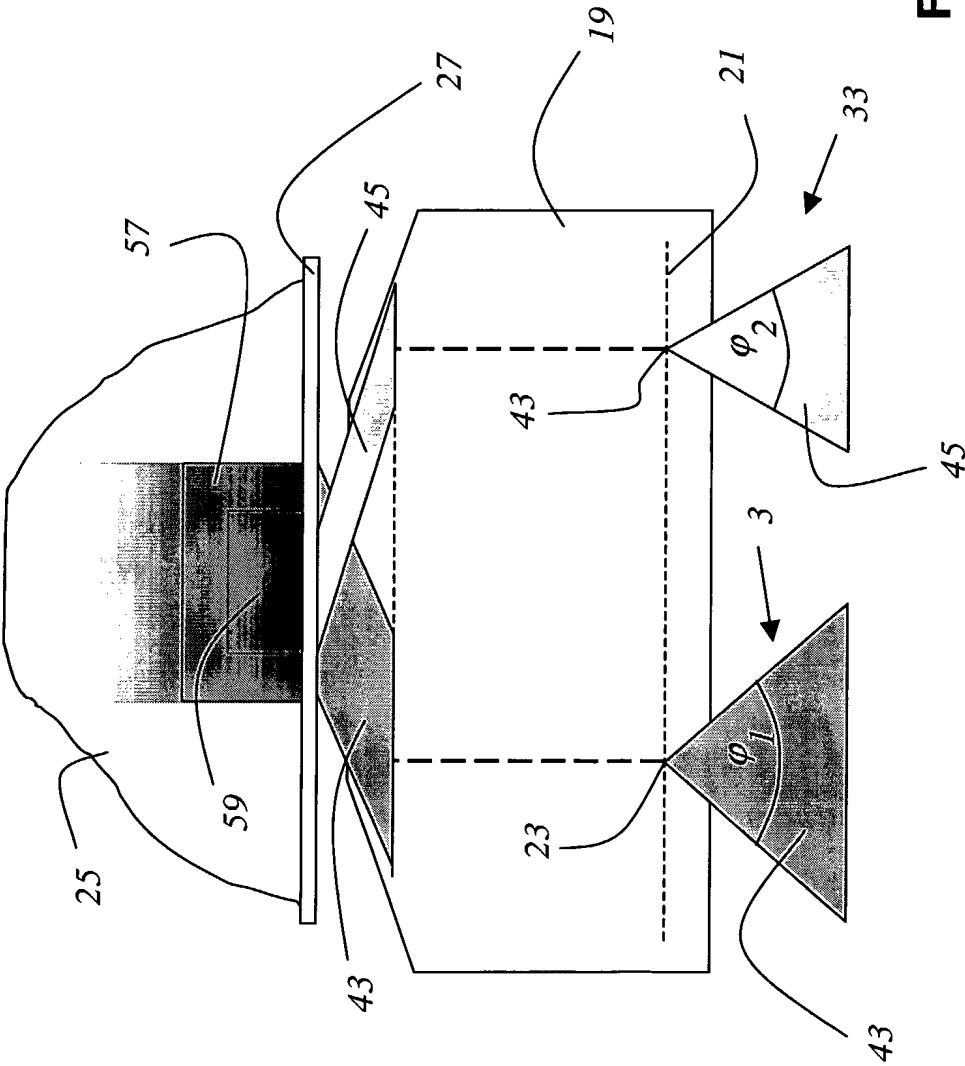


Fig. 2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP2004/052293

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 G02B21/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 G02B

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	OHEIM M ET AL: "MULTIPARAMETER EVANESCENT-WAVE IMAGING IN BIOLOGICAL FLUORESCENCE MICROSCOPY" IEEE JOURNAL OF QUANTUM ELECTRONICS, IEEE INC. NEW YORK, US, vol. 38, no. 2, February 2002 (2002-02), pages 142-148, XP001104420 ISSN: 0018-9197	1,6-15, 20-28
Y	the whole document ----- -/--	2-5, 16-19



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

E earlier document but published on or after the international filing date

L document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

O document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

P document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

& document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

27 January 2005

Date of mailing of the international search report

14/02/2005

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040. Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Windecker, R

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	FLORIAN SCHAPPER, JOSÉ TIAGO GONCALVES, MARTIN OHEIM: "Fluorescence imaging with two-photon evanescent wave excitation" EUROPEAN BIOPHYSICAL JOURNAL, vol. 32, 3 September 2003 (2003-09-03), pages 635-643, XP002315233 cited in the application	1, 15
Y	page 635 - page 637; figures 1A-C -----	2-5, 16-19
X	DE 101 43 481 A1 (EUROPAEISCHES LABORATORIUM FUER MOLEKULARBIOLOGIE) 20 March 2003 (2003-03-20) cited in the application figures paragraph '0044! - paragraph '0077! -----	1-4, 15-18
A	US 4 405 237 A (MANUCCIA ET AL) 20 September 1983 (1983-09-20) cited in the application figure column 2, line 58 - column 4, line 63 -----	6-8, 20-22

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP2004/052293

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
DE 10143481	A1	20-03-2003	CA 2459363 A1	20-03-2003
			WO 03023483 A2	20-03-2003
			EP 1423746 A2	02-06-2004
			US 2004240046 A1	02-12-2004
<hr/>				
US 4405237	A	20-09-1983	NONE	
<hr/>				

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 G02B21/00

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 G02B

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie ^o	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	OHEIM M ET AL: "MULTIPARAMETER EVANESCENT-WAVE IMAGING IN BIOLOGICAL FLUORESCENCE MICROSCOPY" IEEE JOURNAL OF QUANTUM ELECTRONICS, IEEE INC. NEW YORK, US, Bd. 38, Nr. 2, Februar 2002 (2002-02), Seiten 142-148, XP001104420 ISSN: 0018-9197	1,6-15, 20-28
Y	das ganze Dokument ----- -/--	2-5, 16-19

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

- *A* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
- *E* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
- *L* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
- *O* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
- *P* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

Z Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

27. Januar 2005

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

14/02/2005

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Windecker, R

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	FLORIAN SCHAPPER, JOSÉ TIAGO GONCALVES, MARTIN OHEIM: "Fluorescence imaging with two-photon evanescent wave excitation" EUROPEAN BIOPHYSICAL JOURNAL, Bd. 32, 3. September 2003 (2003-09-03), Seiten 635-643, XP002315233 in der Anmeldung erwähnt	1, 15
Y	Seite 635 - Seite 637; Abbildungen 1A-C -----	2-5, 16-19
X	DE 101 43 481 A1 (EUROPAEISCHES LABORATORIUM FUER MOLEKULARBIOLOGIE) 20. März 2003 (2003-03-20) in der Anmeldung erwähnt Abbildungen Absatz '0044! - Absatz '0077! -----	1-4, 15-18
A	US 4 405 237 A (MANUCCIA ET AL) 20. September 1983 (1983-09-20) in der Anmeldung erwähnt Abbildung Spalte 2, Zeile 58 - Spalte 4, Zeile 63 -----	6-8, 20-22

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2004/052293

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
DE 10143481	A1	20-03-2003	CA	2459363 A1	20-03-2003
			WO	03023483 A2	20-03-2003
			EP	1423746 A2	02-06-2004
			US	2004240046 A1	02-12-2004
<hr/>					
US 4405237	A	20-09-1983	KEINE		